

### **Metabolismo dell'azoto**

Poiché i composti azotati solubili in genere non sono molto abbondanti in natura, l'ammoniaca, gli aminoacidi e i nucleotidi sono utilizzati con molta parsimonia dalla maggior parte degli organismi viventi. Analizzeremo per prime le vie attraverso cui l'azoto presente nell'ambiente viene introdotto nei sistemi biologici.

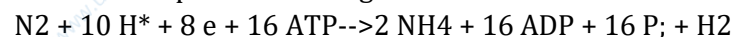
I processi metabolici di organismi diversi agiscono in modo interdependente per recuperare e riutilizzare l'azoto (N<sub>2</sub>) disponibile per i processi biologici creando un grande ciclo dell'azoto. La prima tappa del ciclo dell'azoto è la fissazione (riduzione) dell'azoto atmosferico da parte dei batteri che trasformano l'azoto in ammoniaca.

I batteri del suolo producono l'energia di cui hanno bisogno ossidando l'ammoniaca a nitrito (NO<sub>2</sub>) e successivamente a nitrato (NO<sub>3</sub>), mediante un processo noto con il nome di nitrificazione. Le piante e altri batteri possono facilmente assumere e ridurre il nitrito e il nitrato in ammoniaca, che può essere incorporata nella molecola degli aminoacidi dalle piante. Gli animali utilizzano poi le piante come fonte di aminoacidi essenziali e non essenziali per costruire le loro proteine. Il bilancio tra azoto fissato e azoto atmosferico è mantenuto convertendo il nitrato in N<sub>2</sub> in condizioni anaerobiche, un processo chiamato denitrificazione. I batteri del suolo utilizzano l'NO<sub>3</sub>, invece dell'O<sub>2</sub> come accettore di elettroni per generare un gradiente transmembrana di protoni, usato poi per la sintesi di ATP. Il ciclo dell'azoto può essere aggirato da un gruppo di batteri che promuovono l'ossidazione anaerobica dell'ammoniaca, o anammox, un processo che converte l'ammoniaca e il nitrito in N<sub>2</sub>. Oltre il 90% dell'NH<sub>4</sub>, prodotto dalle piante vascolari, dalle alghe e dai microrganismi proviene dall'assimilazione dei nitrati, un processo che si svolge in due tappe. Per prima cosa, l'NO<sub>3</sub>, viene ridotto a NO<sub>2</sub>, dalla nitrito reductasi, poi l'NO<sub>3</sub>, viene ridotto a NH<sub>4</sub> da trasferimento di sei elettroni catalizzato dalla nitrito reductasi. Entrambe le reazioni comprendono catene di trasporto di elettroni e cofattori.

Nella biosfera attuale, solo alcuni batteri e archea possono fissare l'azoto atmosferico, tra cui i cianobatteri del suolo e delle acque dolci e salate, gli archea metanogenici, e tre specie di batteri del suolo e batteri fissatori di azoto che vivono come simbionti nei noduli delle radici delle leguminose. La riduzione dell'azoto in ammoniaca è una reazione esoergonica:



Il triplo legame N=N è molto stabile, con un'energia di legame di 930 kJ/mol. La fissazione dell'azoto, quindi, ha un'energia di attivazione molto alta, tanto che l'azoto atmosferico è praticamente inerte in condizioni normali. Nella fissazione biologica dell'azoto la barriera costituita dall'energia di attivazione deve essere superata con il contributo energetico fornito almeno in parte dall'ATP. La reazione complessiva è la seguente:



La fissazione biologica dell'azoto è catalizzata da un complesso di proteine altamente conservate chiamato complesso della nitrogenasi, i cui componenti principali sono la dinitrogenasi reductasi e la dinitrogenasi. La dinitrogenasi reductasi contiene un singolo centro redox 4Fe-4S che può essere ossidato e ridotto da un singolo elettrone. L'enzima ha anche due siti per l'ATP/ADP. La dinitrogenasi possiede due cofattori contenenti ferro che trasferiscono elettroni. Il gruppo P ha una coppia di centri 4Fe-4S che condividono un atomo di zolfo e formano un centro 8Fe-7S.

Il secondo cofattore è il cofattore FeMo, una struttura composta da 7 atomi di Fe, da 9 atomi di S inorganico, da una catena laterale di Cys e da un singolo atomo di carbonio posizionato al centro del gruppo FeS. Fa parte del cofattore anche un atomo di molibdeno. La fissazione dell'azoto è catalizzata da una forma altamente ridotta di dinitrogenasi e richiede otto elettroni: sei per la riduzione dell'azoto e due per produrre una molecola di H<sub>2</sub>. La dinitrogenasi viene ridotta dal trasferimento di elettroni dalla dinitrogenasi reductasi. L'immediata fonte di elettroni per ridurre la dinitrogenasi reductasi varia. La ferredossina ridotta, la flavodossina ridotta e forse altre fonti svolgono questa funzione. La fonte di elettroni per la riduzione della ferredossina può essere il piruvato.

Nella reazione catalizzata dalla dinitrogenasi reductasi, il legame e l'idrolisi dell'ATP provocano nelle proteine coinvolte modificazioni conformazionali che favoriscono il superamento dell'elevata energia

di attivazione della reazione di fissazione dell'azoto. Il complesso della nitrogenasi è estremamente instabile in presenza di ossigeno. La reduttasi diventa inattiva in presenza di aria, con una vita media di 30 secondi; la dinitrogenasi ha un'emivita media di 10 minuti se esposta all'aria. Per risolvere il problema della tossicità dell'ossigeno, i batteri sono immersi in una soluzione di una proteina contenente un gruppo eme che lega l'ossigeno, la leghemoglobina, prodotta dalla pianta (anche se l'eme può essere fornito dai batteri). La leghemoglobina lega tutto l'ossigeno disponibile, che non potrà quindi interferire con la fissazione dell'azoto. La fissazione dell'azoto è un processo energeticamente costoso: 16 molecole di ATP e 8 coppie di elettroni producono solamente due molecole di NH<sub>3</sub>. Non è quindi sorprendente che il processo sia finemente regolato in modo da garantire la produzione di NH<sub>3</sub> solo quando è necessario.

*L'ammoniaca è incorporata nelle biomolecole tramite il glutammato e la glutammina*

Il punto di ingresso dell'azoto nel processo di assimilazione è rappresentato da due amminoacidi, il glutammato e la glutammina. Le vie biosintetiche che producono glutammato e glutammina sono semplici e sono simili in tutte le forme di vita. La via principale per il legame dell'ammoniaca al glutammato richiede due reazioni. Nella prima, il glutammato reagisce con l'NH<sub>3</sub>, formando glutammina, una reazione catalizzata dalla glutammina sintetasi. Questa reazione avviene in due tappe, con il complesso  $\gamma$ -glutammina fosfato-enzima come intermedio:

Glutammato + ATP →  $\gamma$ -glutammina fosfato + ADP

$\gamma$ -Glutammina fosfato + NH<sub>3</sub> → glutammina + P<sub>i</sub> + H<sup>+</sup>

Somma: Glutammato + NH<sub>3</sub> + ATP → glutammina + ADP + P<sub>i</sub> + H<sup>+</sup>

La glutammina sintetasi è presente in tutti gli organismi. Nei batteri e nelle piante il glutammato viene prodotto dall'enzima glutammato sintasi. Il nome alternativo di questo enzima è glutammato ossoglutarato amminotrasferasi (GOGAT). L' $\alpha$ -chetoglutarato, un intermedio del ciclo dell'acido citrico, va incontro a una amminazione riduttiva in cui la glutammina è il donatore dell'azoto:

$\alpha$ -Chetoglutarato + glutammina + NADPH + H<sup>+</sup> → 2 glutammato + NADP<sup>+</sup>

La somma delle reazioni di questi due enzimi (glutammina sintetasi e glutammato sintasi) è:

$\alpha$ -Chetoglutarato + NH<sub>3</sub> + NADPH + ATP → glutammato + NADP<sup>+</sup> + ADP + P<sub>i</sub>

Negli animali questo amminoacido viene mantenuto ad alte concentrazioni dalle reazioni di transamminazione in cui l' $\alpha$ -chetoglutarato raccoglie tutti i gruppi amminici durante il catabolismo degli amminoacidi. Il glutammato si può formare anche mediante la reazione dell' $\alpha$ -chetoglutarato con NH<sub>3</sub> catalizzata dalla glutammato deidrogenasi, un enzima presente in tutti gli organismi.

*Diverse reazioni hanno funzioni speciali nella biosintesi di amminoacidi e nucleotidi*

Alcuni riarrangiamenti chimici ricorrono spesso e meritano di essere citati prima ancora di trattare le vie metaboliche in cui sono coinvolti: (1) le reazioni di transamminazione e altre reazioni promosse da enzimi contenenti piridossal fosfato; (2) il trasferimento di unità monocarboniose utilizzando come cofattori il tetraidrofolato o l'S-adenosilmetionina; (3) il trasferimento di gruppi amminici derivati dall'azoto ammidico della glutammina. La glutammina è la principale fonte fisiologica di ammoniaca in più di una decina di reazioni biosintetiche conosciute. Gli enzimi che catalizzano queste reazioni sono considerati come una classe, sono chiamati glutammina ammidotrasferasi e possiedono tutti due domini strutturali: un dominio lega la glutammina, mentre l'altro lega il secondo substrato, che agisce come accettore del gruppo amminico. Nella reazione si scinde il legame ammidico della glutammina e si forma un intermedio covalente glutammil-enzima. L'ammoniaca prodotta dalla prima reazione viene trasferita attraverso un "canale NH<sub>3</sub>" in un secondo sito attivo, dove reagisce con il secondo substrato generando il prodotto amminato.

### **CATABOLISMO DEGLI AMMINOACIDI**

I carnivori mangiano soprattutto proteine, e quindi da esse devono ottenere la maggior parte del fabbisogno energetico.

Nelle piante e erbivori raramente ricavano energia dalla degradazione degli amminoacidi.

Negli animali gli AA vengono degradati quando sono liberati dalla degradazione di proteine dell'organismo /tessuti/cellule, quando sono assimilati in eccesso con la dieta (rispetto a quelli necessari per la sintesi proteica), e per produrre energia in condizioni patologiche (diabete) o a digiuno.

Una parte di AA deriva dal turnover, ovvero dal ricambio di proteine endogene (in condizioni cellulari particolari o quando le proteine sono degradate perché piegate scorrettamente).

Nell'uomo le proteine sono degradate nell'apparato gastro intestinale. Nello stomaco la mucosa gastrica secerne gastrina, le cellule parietali HCl e le cellule delle ghiandole gastriche di pepsinogeno. L'HCl ha una doppia funzione: antisettica (uccide batteri,...) e denaturante, perché riduce il foolding delle proteine.

Il pepsinogeno è secreto in forma inattiva, e, nello stomaco, per il pH basso è attivato per autocatalisi, e scinde i legami peptidici delle proteine.

La miscela peptidica va poi nell'intestino tenue, dove c'è la secretina, che stimola il pancreas a secernere bicarbonato. Questo neutralizza l'acidità della miscela peptidica. Nel duodeno è secreta anche la colecistochinina che stimola la secrezione, da parte delle cellule esocrine del pancreas, degli zimogeni (tripsinogeno, chimotripsinogeno e procarbosipectidasi A e B).

Il tripsinogeno è attivato a tripsina dall'enteropeptidasi. La tripsina per autocatalisi induce il rilascio di altro tripsinogeno e l'attivazione della chimitripsina e la carbosipectidasi A e B.

La secrezione degli zimogeni in forma inattiva protegge le cellule della proteolisi.

Tripsina rompe il legame tra gli amminoacidi basici, la chimitripsina tra quelli idrofobici, l'elastasi tra piccoli AA neutri e la carbosipectidasi A aromatici e B per i basici.

Mentre a livello dell'orletto striato ci sono enzimi che scindono i peptidi in AA, a livello intracellulare ci sono tri e di peptodasi (!nel citoplasma degli enterociti). Gli amminoacidi di e tripeptidi sono trasportati attivamente nelle cellule intestinali: Gli aa insieme al sodio, e i di/tripeptidi assieme ai protoni, con trasporto Pept1.

Esistono 5 trasportatori per il trasporto attivo.

Per gli AA principalmente di tipo idrofobico esiste un altro tipo di trasporto Indipendente al sodio, che avviene per diffusione facilitata. In presenza di una mucosa danneggiata, come per i celiaci, ci può essere la coptazione paracellulare nello spazio tra due cellule.

Alcuni possono essere trasportati anche per pinocitosi, ma questo provoca problemi allergici.

Nel colon, infine, possono arrivare una parte di proteine non scisse, che vengono digerite o dai batteri della flora intestinale o sono eliminate con le feci.

#### *Trasportatori degli amminoacidi*

- Trasportatori con attività ATPasica. È un trasporto attivo che aiuta anche a mantenere l'equilibrio transmembrana degli ioni sodio-potassio.
- I trasportatori secondari attivi accoppiano il trasporto di amminoacidi al gradiente elettronico
- Altri trasportano gli amminoacidi con meccanismi antiporto

In alcuni casi basta il legame dell'aa al trasportatore per attivare un evento di segnalazione: ad esempio di trasportatori del glutammato, se lo legano, diventano anche dei canali per il cloro.

I cambiamenti del flusso amminoacidi è quindi trasmessa in queste vie di segnale mediate da proteine G.

Le proteine, una volta attraversati gli enterociti, raggiunge i capillari. Una volta metabolizzati nel fegato, gli AA entrano nel torrente circolatorio.

#### *Destino degli AA nel fegato:*

Gli aa possono essere usati per:

- Fare proteine
- Produrre energia tramite corpi chetonici e glucosio
- Fare ammine biogene (istamina, adrenalina, serotonina,...) tramite la decarbossilazione
- Precursori di molecole biologiche come eme e basi azotate

- Con la trasaminazione porta alla formazione di glutammato, da cui si può ottenere aspartato e ione ammonio. L'ione ammonio può essere usato in vie biosintetiche e quello in eccesso è degradato nel ciclo dell'urea ed eliminato con urina.

Gli aminoacidi, per essere usati, devono essere privati del gruppo amminico, tramite reazioni di trasaminazione e deamminazione, e gli scheletri carboniosi sono degradati generando alfa-chetoacidi (usati in vie metaboliche come ciclo di krebs).

Il ciclo dell'urea (per eliminare ammonio) e dell'acido citrico sono separate ma Interconnesse dallo shunt aspartato-arginino-succinato.

## Deamminazione degli aminoacidi

3 aspetti fondamentali:

- Trasaminazione
- Deamminazione ossidativa con la glutammato deidrogenasi
- Altri meccanismi di deamminazione

### Transaminazione

Avviene nel citosol. Un aminoacido è deamminato tramite il trasferimento del suo gruppo amminico su un alfa-chetoacido, per produrre un nuovo aminoacido, e l'alfachetoacido dell'amminoacido originale.

L'accettore principale di gruppo amminici è l'alfchetoglutarato, producendo glutammato come nuovo aminoacido.

La reazione è catalizzata da amminotrasferasi, che usano come coenzima il PLP (piridossal5'fosfato, derivato da vitB6), che così diventa piridossamina 5'fosfato (PMP).

Il PLP è legato covalentemente all'amminogruppo di una lys 258 dell'enzima, come una base di shift.

La catalisi avviene in 2 fasi Con 3 step.

Inizialmente il gruppo amminico dell'amminoacido attacca il carbonio della base di shift PLP-enzima, determinando la liberazione dell'enzima con una lys libera. Questa lys agisce come base di shift nel sito attivo. L'aa legato al PLP poi può tautomerizzare in alfa-chetoacidopl → reazione promossa dalla lys che stabilizza.

Le 3 reazioni (step) sono: transaminazione, trautomerizzazione e idrolisi.

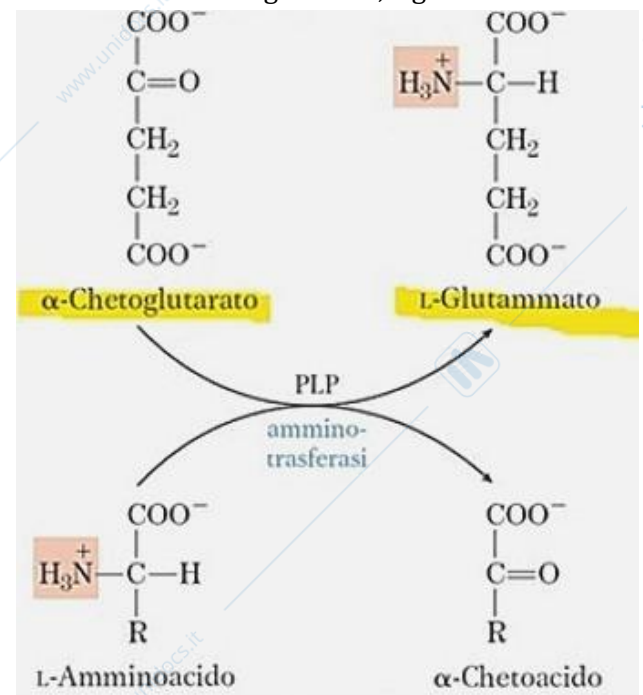
Esse possono essere fatte al contrario (fase 2), usando come substrato l'alfachetoglutarato, e genererà glutammato e soprattutto serve per rigenerare l'enzima attivo.

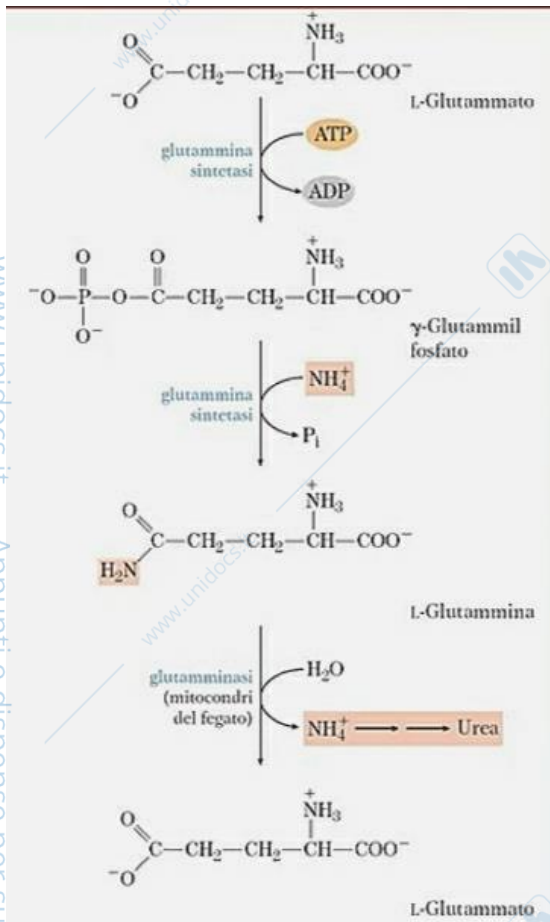
Le amminotrasferasi differiscono per la specificità del substrato, possono usare qualsiasi substrato ma di solito accettano solo ossalacetato, per generare aspartato, o alfa-chetoglutarato per formare glutammato.

Nel siero, la misura di alcune trasaminasi ha scopo diagnostico, come la alanina amminotrasferasi (se c'è rottura cellulare) e l'aspartato amminotrasferasi (per danni cardiaci, epatici o intossicazione, concentrata nei mitocondri).

### Ciclo del glucosio-alanina

Nel muscolo scheletrico c'è un'eccezione, perché è accettato il piruvato come alfa-chetoacido, e si genera alanina. L'alanina è rilasciata in circolo e trasportata al fegato, dove è trasaminata trasferendo il suo gruppo amminico sull'alfachetoglutarato, che rigenera piruvato e glutammato. Il glutammato va nel ciclo dell'urea e il





piruvato fa gluconeogenesi per produrre glucosio (che torna nel circolo e va nel muscolo per fare la glicolisi).

Questo ciclo può essere abbinato al ciclo di cori, ed è un processo di economia per l'organismo perché c'è il recupero massimo di energia. **Vedi libro**

In carenza di energia questo ciclo è interrotto, perché il glucosio serve anche per altri tessuti periferici, e quindi il glucosio generato nel fegato dall'alanina non ritorna solo al muscolo.

C'è da considerare però che l'ammoniaca è molto tossica per i tessuti animali e quindi va rimossa, inglobandola nel glutammato. la prima reazione richiede atp, e si forma gammaglutamminfosfato dal glutammato. Questo composto è ad alta energia, e tramite la liberazione del gruppo fosforico è guidata la reazione. Al posto del fosfato è aggiunto lo ione ammonio derivati dai tessuti. Si ottiene così glutammina, la quale può essere inviata al fegato per distruggerla, formando urea che è eliminata con l'urina.

### Deamminazione ossidativa del glutammato

È una reazione importante, perché c'è continuamente bisogno, Nella deamminazione, di alfa-chetoglutarato. Questo è quindi prodotto del mitocondri, tramite deamminazione ossidativa catalizzata dalla glutammato deidrogenasi, partendo dal glutammato e usando come coenzima il NAD. Il protone è trasferito dal glutammato al NAD, e si forma un intermedio che poi viene idrolizzato al alfa-chetoglutarato e ammoniaca.

La *glutammato deidrogenasi* è un enzima molto importante e finemente regolato allostericamente negli animali.

Il GTP è inibitore allosterico, come il palmitoyl e il coA (aumentano l'affinità per il prodotto, che quindi non viene rilasciato). L'ADP è un attivatore, e agisce promuovendo il rilascio del prodotto. Anche la leucina è un attivatore. Inoltre la glutammato deidrogenasi è influenzata anche da altri enzimi delle vie mitocondriali.

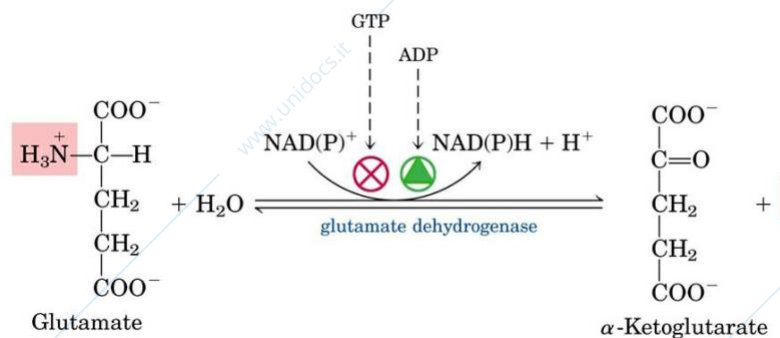
Nell'uomo e nelle scimmie c'è una glutammato deidrogenasi particolare, la GDH2, mancante di un introne. Si pensa che questa alterazione sia recente, e questo enzima è espresso particolarmente nei mitocondri nei neuroni e nel tessuto testicolare. È meno sensibile all'inibizione della GTP ma è più sensibile all'ADT. È meno termostabile. In parte si trova anche nel RE.

L'inibizione data dal GTP è superata facilmente con ADP, perché essa è molto più affine.

Raramente la glutammato deidrogenasi può operare la reazione contraria, diretta verso la produzione di glutammato, in quando il NADH si trova in concentrazioni molto inferiori rispetto al nad.

L'iperinsulinemia e l'iperammonemia, si hanno quando quando c'è una perdita dell'inibizione operata dal GTP sull'enzima. Questo porta ad un aumento dello ione ammonio ed a una secrezione eccessiva di insulina. Si accumula quindi alfa-chetoglutarato nel ciclo di krebs.

Questo enzima è anche altamente conservato. La glutammato deidrogenasi è anche coinvolta, assieme ad altri metaboliti, dell'oncogenesi. Mutazioni somatiche degli enzimi del ciclo di krebs, come l'isocitrato deidrogenasi, si verifica nel 70% degli gliomi. Quando è mutata, l'isocitrato deidrogenasi al posto di formare alfa-chetoglutarato forma



di, 2idrossiglutarato, che è un oncometabolita che attiva altro metabolismi diversi da quelli regolati dalla glutammato deidrogenasi.

In particolare questo intermedio inibisce delle diossigenasi, che compatterebbero la cromatica, con la metilazione, per regolare l'espressione genica. Questo porta quindi a una maggior espressione nelle cellule tumorali di glutammato deidrogenasi.

Alterazioni oncogeniche del metabolismo rendono le cellule tumorali dipendenti dalle sostanze nutritive, e i percorsi metabolici per questo possono essere sfruttati come bersagli per lo studio di terapie.

I tumori sono praticamente dipendenti della glutammina, che fornisce alfa-chetoglutarato che alimenta il ciclo dell'acido tricarbossilico. Inoltre aumenta la biosintesi di acidi grassi, modificando l'equilibrio redox delle cellule tumorali. Attiva anche diversi segnali, come mTOR, per la crescita cellulare.

Altri meccanismi di deaminazione usano le amminossidasi, che sono flavoenzimi (usano FAD). Sono ossidasi stereospecifiche, ovvero agiscono su diversi tipi di amminoacidi, L o D.

La *sclerosi laterale amiotrofica* è dovuta a un'eccitabilità aberrante dei motoneuroni, che porta alla morte di queste cellule. È dovuta a una mutazione di un gene che codifica per una D-amminossidasi, e che porta alla downregolazione di essa, che normalmente deamina la serina. La D-serina si accumula provocando quindi la SLA. La D-serina è infatti un coagonista del recettore N-metil-D-aspartato, che provoca eccitabilità nel cervello.

Anche altre malattie mentali, come la schizofrenia, sono legate a queste cose.

### **Ciclo dell'urea**

Una parte di ioni ammonio generate dal metabolismo degli AA è usata in altre vie biosintetiche, mentre l'eccesso deve essere rimosso per non bloccare l'ingresso dell'alfa-chetoglutarato nel ciclo di Krebs. È convertito quindi in urea nella maggior parte dei vertebrati.

L'accumolo di ammoniaca, inoltre, essendo un composto molto tossico provoca diversi problemi, soprattutto per il cervello. Nel circolo sanguigno al 98% è protonata a ione ammonio, ma la piccola parte di ammoniaca può diffondere dalle membrane e raggiungere il cervello, superando la barriera emato-encefalica.

Ciò porta a patologie come l'encefalopatia epatica. Gli astrociti nel cervello metabolizzano l'ammoniaca attraverso la reazione di sintesi della glutammina partendo dal glutammato e ammoniaca, e quindi sono le principali vittime della tossicità data dall'ammoniaca → si forma edema cerebrale

Il glutammato, nel cervello, è il precursore dell'acido gamma-amminobutirrico (GABA), prodotto dalla glutammina. Il GABA è un neurotrasmettitore, rilasciato a livello sinaptico e quindi poi interagisce con gli appositi recettori nelle cellule post sinaptiche.

Il trasporto verso gli astrociti ha maggiore affinità, e questi hanno maggior attività della glutammina sintasi, così che il glutammato e il GABA sono metabolizzati in glutammina. La glutammina è secreta, ma non avendo effetto da neurotrasmettitore, può essere revocata entrando nei neuroni per riformare glutammato o GABA.

L'ammoniaca altera negli astrociti questo ciclo glutammina-gluttammato, e ciò influenza le interazioni per accumulo del glutammato.

Inoltre l'ammoniaca causa danni anche nelle altre cellule, perché fa variare il pH, il metabolismo e il potenziale di membrana.

L'ammoniaca è quindi degradata nel fegato, trasformandola in urea, che poi entra nel sangue e dai reni è espulsa con le urine.

Il ciclo dell'urea inizia all'interno dei mitocondri degli epatociti, ma tre delle tappe successive avvengono nel citosol. Il primo gruppo amminico a entrare nel ciclo dell'urea deriva dall'ammoniaca già presente all'interno dei mitocondri e prodotta attraverso le varie tappe che abbiamo descritto in precedenza. Qualunque sia la fonte, l'NH presente nei mitocondri viene immediatamente utilizzato, insieme alla CO<sub>2</sub> (sotto forma di HCO<sub>3</sub>, prodotto di scarto del metabolismo), per formare carbamil

fosfato. Questa reazione che consuma due ATP ha luogo nella matrice dei mitocondri ed è catalizzata dall'enzima carbamil fosfato sintetasi I.

Esistono due tipi di carbamil fosfato:

La carbamil fosfato 1 è una forma citosolica che al posto di usare ammoniaca usa glutamina come fonte di azoto, ed è coinvolta nell'biosintesi delle piramidine.

La reazione catalizzata dalla carbamilfosfato sintetasi I prevede 3 step:

1. Attivazione ione idrogeno carbonato mediante una ATP per formare carbossifosfato (legato alla enzima) e liberare ADP.
2. Attacco sul carbonile da parte dell'ammoniaca, liberando pirofosfato e carbamato (legato a enzima).
3. Consumando un secondo atp, che reagisce con il carbamato legato all'enzima, si ottiene il carbamil fosfato libero.

L'enzima ha due siti diversi per le due atp che usa, ed è una reazione irreversibile controllata allostericamente da n-acetilglutammato, un effettore positivo.

Questa molecola è sintetizzata da acetil coA e glutammato, grazie al acetilglutammato sintetasi, che a sua volta è regolato positivamente dall'arginina e negativamente dal prodotto (n acetilglutammato).

L'esaurimento di acetil CoA riduce la sintesi dell'urea → si verifica in acidemia organica (es: propionica), dove gli acidi organici prodotti in eccesso competono con il coA per la formazione dei suoi derivati.

L'n acetilglutammato è idrolizzato da un idrolasi, e nel fegato la sua concentrazione regola la velocità del ciclo dell'urea stesso.

Il carbamil fosfato, che può essere considerato un donatore di gruppi carbamilici attivati, entra quindi nel ciclo dell'urea. Questa via metabolica ciclica è costituita da quattro tappe enzimatiche.

Innanzitutto il carbamil fosfato dona il suo gruppo carbamilico all'ornitina per formare citrullina, con il contemporaneo rilascio di P. La reazione è catalizzata dall'ornitina transcarbamilasi. L'ornitina non fa parte dei 20 amminoacidi standard presenti comunemente nelle proteine, ma è un intermedio chiave del metabolismo dell'azoto. L'ornitina svolge un ruolo simile a quello dell'ossalacetato nel ciclo dell'acido citrico, accettando un'unità di carbamile a ogni giro del ciclo dell'urea. La citrullina prodotta nella prima tappa del ciclo dell'urea esce dai mitocondri, attraverso un apposito sistema di trasporto, e il ciclo continua nel citosol.

Le due tappe successive forniscono il secondo gruppo amminico. La fonte è l'aspartato prodotto nei mitocondri per transaminazione e trasportato nel citosol. Una reazione di condensazione tra il gruppo amminico dell'aspartato e il gruppo carbonilico della citrullina genera il composto argininosuccinato. Questa reazione citosolica, catalizzata dall'enzima arginino-succinato sintetasi, richiede ATP e procede attraverso la formazione di un intermedio citrullil-AMP. L'argininosuccinato viene poi scisso reversibilmente dall'argininosuccinasi, che produce arginina e fumarato. Questa è l'unica reazione reversibile del ciclo dell'urea. Infine (tappa O), l'enzima citosolico arginasi scinde l'arginina in urea e ornitina; quest'ultima entra nei mitocondri per iniziare un altro giro del ciclo dell'urea.

Il fumarato prodotto nella reazione dell'argininosuccinasi è anche un intermedio del ciclo dell'acido citrico. I due cicli sono quindi, in teoria, collegati in un processo detto "biciclo di Krebs". Tuttavia ciascun ciclo può operare indipendentemente dall'altro, e la loro comunicazione è dovuta al passaggio di intermedi tra i mitocondri e il citosol. Diversi enzimi del ciclo dell'acido citrico, tra cui la fumarasi (fumarato idratasi) e la malato deidrogenasi, sono presenti anche nel citosol in forme isozimatiche diverse. Non vi sono però trasportatori che possano trasferire di nuovo il fumarato prodotto durante la sintesi di arginina nel citosol nella matrice mitocondriale. Il fumarato citosolico può essere convertito in malato ed essere trasportato nei mitocondri, dove viene utilizzato nel ciclo dell'acido citrico. L'aspartato si forma nei mitocondri mediante transaminazione dell'ossalacetato a opera del glutammato. I cicli dell'urea e dell'acido citrico sono strettamente legati da un processo che genera equivalenti riducenti sotto forma di NADH all'interno del mitocondrio. Gli equivalenti riducenti vengono trasportati all'interno del mitocondrio convertendo l'aspartato in ossalacetato nel citosol,

riducendo l'ossalacetato a malato mediante gli equivalenti riducenti del NADH e trasportando il malato nella matrice mitocondriale attraverso il trasportatore malato-a-cheto-glutarato. Una volta all'interno del mitocondrio, il malato può essere riconvertito in ossalacetato, con la contemporanea rigenerazione del NADH. L'ossalacetato viene convertito in aspartato nella matrice e poi trasportato al di fuori del mitocondrio tramite il trasportatore aspartato-glutammato.

**Costo energetico:**

La sintesi di una molecola di urea richiede quattro gruppi fosforici ad alta energia. Occorrono due molecole di ATP per formare il carbamil fosfato e serve una molecola di ATP per produrre argininosuccinato; quest'ultima molecola di ATP va però incontro a una scissione in AMP e PP, che viene idrolizzato in due gruppi fosforici liberi.

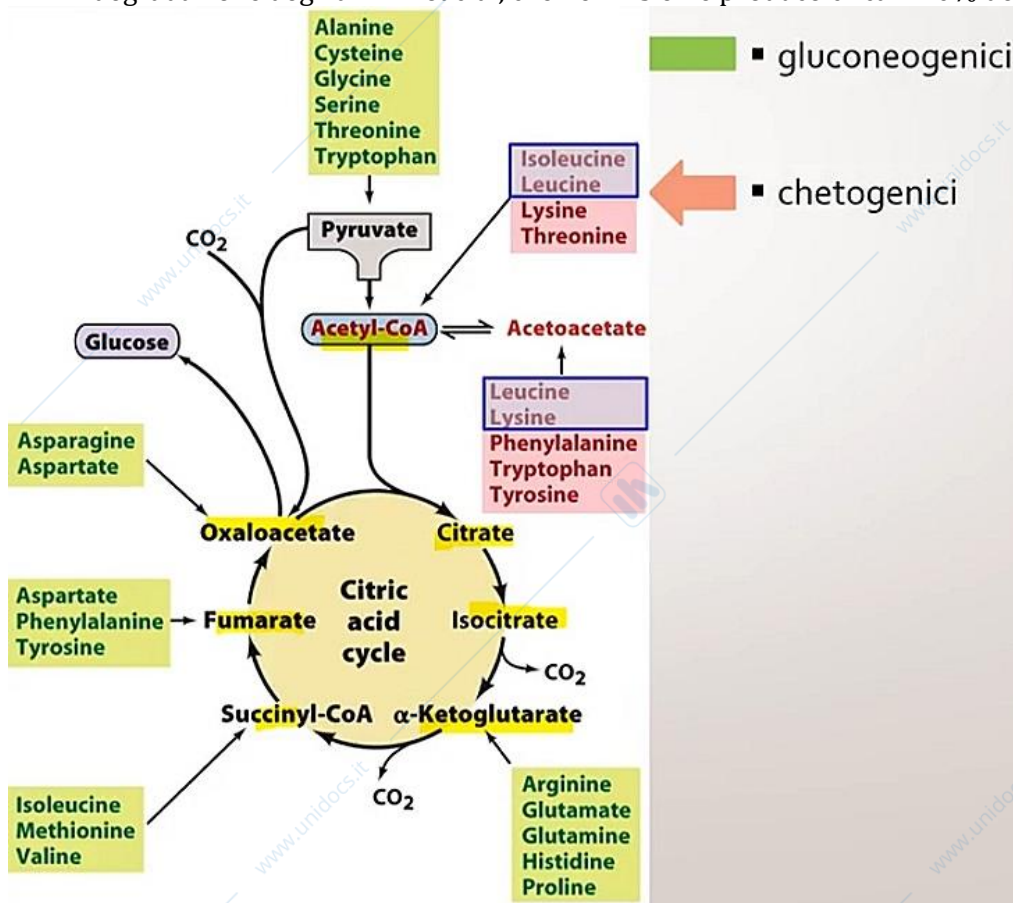
La reazione complessiva del ciclo dell'urea è:  $2 \text{NH}_4 + \text{HCO}_3 + 3 \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{urea} + 2 \text{ADP} + 4 \text{P} + \text{AMP} + 2 \text{H}^+$  Tuttavia, il fumarato generato dal ciclo dell'urea viene convertito in malato, che viene poi trasportato all'interno del mitocondrio dove si ha la produzione di NADH nella reazione catalizzata dalla malato deidrogenasi. Ciascuna molecola di NADH può generare più di 2,5 molecole di ATP durante la respirazione mitocondriale, riducendo così il costo energetico della sintesi dell'urea.

Gli enzimi sono regolati principalmente dai loro substrati. Le patologie legate al ciclo dell'urea sono dovute principalmente a deficit di arginasi (ereditario) e porta a scompensi del ciclo. Se manca l'arginasi si accumula arginina e ammoniaca nel sangue, che causano problemi neurologici. Il deficit di arginasi è evidente a 3 anni, e appare come rigidità e anomala tensione muscolare, o ritardi mentali o della crescita. Occasionalmente, in seguito a stress o dieta ricca di proteine, nei soggetti con queste mutazioni si può avere un accumulo di ammoniaca.

**Degradazione dello scheletro carbonioso**

I 20 aminoacidi hanno scheletri carboniosi diversi, ed esistono 20 vie cataboliche per la degradazione degli aminoacidi, che nell'insieme producono circa il 10% dell'energia totale necessaria

all'uomo. Questi 20 processi convergono alla produzione di 7 prodotti in grado di entrare nel ciclo dell'acido citrico, ed essere ossidati completamente a CO<sub>2</sub> e acqua. L'attività della via catabolica varia da aa ad aa, e dipende dalla sua disponibilità e dalle richieste del metabolismo. Se sono in eccesso, inoltre, gli aminoacidi sono degradati a composti gluconeogenici, da cui si può produrre glucosio (piruvato, alfa-chetoglutarato, succinilCoA, fumarato, ossalacetato), oppure a composti chetogenici (acetil CoA o acetoacetato).



I composti chetogenici possono essere convertiti ad acidi grassi o corpi chetonici. Solo la leucina e la lisina sono esclusivamente chetogenici.

Gli amminoacidi a catena ramificata sono gli unici che sono direttamente trasformati in energia nel muscolo, attraverso un complesso multienzimatico analogo strutturalmente a quello della piruvato deidrogenasi. Nel catabolismo degli amminoacidi il trasferimento di unità di carbonio è comune e catalizzato da cofattori:

- Biotina trasferisce CO<sub>2</sub>
- Tetraidrofolato trasferisce unità monocarboniose con stato di ossidazione intermedio, raramente gruppi metilici
- S-adenosil-metionina trasferisce solo gruppi metilici, con il carbonio nello stato più ridotto.

Anche se il tetraidrofolato può trasportare il gruppo metilico sul N-5, il potenziale di trasferimento di questo gruppo è spesso troppo basso per le reazioni biosintetiche, e per questo è usato l'S-adenosil-metionina.

Fenilchetonuria: libro

### ***Biosintesi degli amminoacidi***

Tutti gli amminoacidi derivano da intermedi della glicolisi, del ciclo dell'acido citrico o della via del pentosio fosfato. L'azoto entra nelle vie di biosintesi degli amminoacidi come glutammato o glutammina. Mentre la maggioranza dei batteri e le piante possono sintetizzarli tutti e venti, i mammiferi possono sintetizzarne solo una decina, in genere tramite vie semplici. Si tratta degli amminoacidi non essenziali. I rimanenti, gli amminoacidi essenziali, devono essere assunti con la dieta. Le vie di biosintesi degli amminoacidi, possono essere raggruppate in sei famiglie, corrispondenti ai loro precursori metabolici.

Tutti gli amminoacidi non essenziali, ad eccezione della tirosina, sono sintetizzati da vie semplici che includono come intermedi piruvato, alfa-chetoglutarato, 3-fosfoglicerato, ossalacetato.

La tirosina deriva dall'idrossilazione della fenilalanina (AA essenziale).

Gli alfa-chetoadidi da cui sono prodotti gli amminoacidi sono:

- Piruvato → alanina
- Ossalacetato → aspartato → (asparagina sintetasi) asparagina
- Alfa-chetoglutarato → glutammato → (glutammina sintetasi) glutammina

La sintesi di questi amminoacidi coinvolge reazioni di trasaminazione.

La glutammina sintetasi è un enzima centrale nel controllo del metabolismo dell'azoto, ed è il donatore di gruppi amminici o una forma di stoccaggio dei gruppi amminici nella cellula.

È attivata dall'alfa-chetoglutarato per evitare l'accumulo di ammoniaca. Nei batteri è molto controllato, con 9 inibitori allosterici, ognuno con un sito specifico e con azione anche cumulativa.

In *E. coli* la glutammina sintetasi è modificata dall'adenilazione di una Tyr, e i livelli di adenilazione sono controllati da una cascata cellulare simile a quella che si ha per la glicogeno fosforilasi. Sia la adenilazione che la deadenilazione sono controllate da un apposito enzima, l'adenililtrasferasi, che a sua volta è controllato dalla uridililtrasferasi.

Quando l'adenililtrasferasi nella forma senza uridina, interagisce con la glutammina sintetasi deadenilata e ne favorisce la adenilazione. Se interviene la forma uridinilata della adenililtrasferasi, viene fosforata la glutammina sintetasi e quindi viene disattivata.

#### *Glutammato come precursore di glutammina, prolina e arginina*

Prima abbiamo visto che il glutammato si forma per amminazione riduttiva dell'alfa-chetoglutarato e che da esso deriva la glutammina. La prolina è un derivato ciclico del glutammato. Nella biosintesi della prolina, l'ATP reagisce con il gruppo  $\gamma$ -carbossilico del glutammato, per formare un acil fosfato che viene ridotto dal NADPH al NADH a glutammato  $\gamma$ -semialdeide. Questo intermedio va incontro a una rapida, spontanea ciclizzazione, per essere poi ulteriormente ridotto a prolina. Negli animali l'arginina

viene sintetizzata a partire dal glutammato, attraverso la formazione di ornitine e il ciclo dell'urea. In realtà, l'ornitina potrebbe essere sintetizzata anche dalla glutammato  $\gamma$ -semialdeide.

### *3-fosfoglicerato come precursore di serina, glicina e cisteina*

La via principale per la formazione della serina è la stessa in tutti gli organismi. Nella prima tappa il gruppo ossidrilico del 3-fosfoglicerato viene ossidato da una deidrogenasi (che usa il NAD<sup>\*</sup>), con produzione di 3-fosfoglicidrossipiruvato. La transaminazione che utilizza glutammato produce la 3-fosfoserina, che viene idrolizzata a serina libera da una fosfoserina fosfatasi. La serina (tre atomi di carbonio) è il precursore della glicina (due atomi di carbonio) attraverso la rimozione di un atomo di carbonio per azione della serina idrossimetiltrasferasi. Il tetraidrofolato accetta il carbonio B (C-3) della serina, generando l'*N,N*10-metilenetetraidrofolato. Nel fegato dei vertebrati la glicina può essere sintetizzata attraverso la reazione catalizzata dalla glicina sintasi (detta anche enzima di scissione della glicina):  $\text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + \text{N}^{10}\text{-metilenetetraidrofolato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{glicina} + \text{tetraidrofolato} + \text{NAD}^+$  Le piante e i batteri producono lo zolfo ridotto per la sintesi della cisteina (e della metionina, come vedremo in seguito) dai solfati dell'ambiente. Il solfato viene attivato in due tappe, con produzione di 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosolfato, che viene poi ridotto a solfuro con l'intervento di otto elettroni. Il solfuro viene poi utilizzato per la formazione della cisteina dalla serina in una via a due tappe. I mammiferi sintetizzano la cisteina a partire da due amminoacidi: la metionina fornisce l'atomo di zolfo e la serina fornisce lo scheletro carbonioso.

## **MOLECOLE DERIVATE DAGLI AMMINOCIDI**

### *La glicina è il precursore delle porfirine*

Le porfirine sono composte da quattro molecole di un derivato monopirrolico, il porfobilinogeno, a sua volta derivato da due molecole di 8-amminolevulinato. Vi sono due vie metaboliche principali che portano al 8-amminolevulinato. Negli eucarioti superiori la glicina e il succinil-CoA formano l' $\alpha$ -ammino-B-chetoadipato, che è poi decarbossilato a 8-amminolevulinato. Nelle piante, nelle alghe e in gran parte dei batteri, il 8-amminolevulinato si forma dal glutammato che viene esterificato a glutammil-tRNA<sub>glu</sub> (vedi il Capitolo 27) e poi in 8-amminolevulinato. Due molecole di 8-amminolevulinato condensano per formare il porfobilinogeno e successivamente, quattro molecole di porfobilinogeno si uniscono per formare la protoporfirina (Figura 22.8). L'atomo di ferro viene incorporato dopo che si è formata la protoporfirina, in una reazione catalizzata dalla ferrochelatasi. Difetti genetici della biosintesi delle porfirine possono condurre all'accumulo di intermedi, responsabili di una serie di malattie che nel loro insieme vengono definite porfirie.

Vedi libro con le reazioni (pag 400) penso sia da sapere

Gli eritrociti sintetizzano l'85% circa dell'eme totale, e anche il fegato sintetizza eme. Nel fegato è sintetizzato principalmente il gruppo prostetico del citocromo P 450 che è un enzima ossidativo coinvolto nella detossificazione. Negli eritrociti invece la biosintesi è indirizzata principalmente verso la produzione di eme. Negli eritrociti l'eme ha una vita media di 2 mesi, e la sua sintesi procede finché c'è emoglobina.

Nel fegato il maggior punto di controllo è sulla deltaamminolevulinato sintasi, ed è controllato dall'eme e la sua forma ossidata elimina. Negli eritrociti, invece, l'eme promuove la sua sintesi.

Un altro elemento che regola questi processi è la presenza di Ferro, trasportato nella cellula dalla transferrina: la sua presenza o meno regola la velocità di sintesi dell'eme.

La velocità di entrata del ferro nelle cellule, attraverso il suo trasportatore, è anche mediato da un apposito recettore, e l'entrata nella cellula avviene per endocitosi.

Altri complessi liposolubili del ferro attraversano la membrana per diffusione, e anch'essi stimolano la biosintesi dell'eme.

Inoltre, il gruppo eme tende ad agire regolando i fattori trascrizionali (piuttosto che gli enzimi), in particolare l'espressione di quelli per l'emoglobina.

La ferroporfirina (o gruppo eme) dell'emoglobina, rilasciata durante la distruzione degli eritrociti nella milza, subisce un processo di degradazione, producendo Fe libero e bilirubina. Questa via metabolica contribuisce anche ai pigmenti presenti nelle miscele di acidi biliari che derivano dal colesterolo. La prima fase della via a due tappe, catalizzata dall'eme ossigenasi, converte l'eme in biliverdina, un derivato lineare del tetrapirrolo. Gli altri prodotti della reazione sono Fe<sup>2+</sup> libero e CO. Fe<sup>2+</sup> si lega subito alla ferritina mentre l'ossido di carbonio, un veleno, si lega all'emoglobina (nel nostro organismo circa l'1% dell'eme è legato al CO prodotto da questo processo). Ciò avviene perché il CO è molto più affine dell'O<sub>2</sub> all'emoglobina. Questa affinità per il CO è leggermente ridotta grazie alla presenza di hys distale sull'alpha e7.

Questo è stato dimostrato perché in soggetti con una mutazione nell'hys 63, in arg, che causa un'emoglobina alterata, si ha il 10% dei siti dell'emoglobina associati al CO (rispetto al solito 1%).

La biliverdina viene convertita in bilirubina nella seconda tappa, catalizzata dalla biliverdina reduttasi. La bilirubina è insolubile in acqua e viene trasportata nel circolo sanguigno legata all'albumina del siero. Nel fegato la bilirubina viene trasformata nel pigmento biliare bilirubina diglucoronide, che è sufficientemente solubile in acqua per essere secreto con gli altri componenti della bile nell'intestino tenue. Nell'intestino la bilirubinadiglucoronide è degradata dai batteri della flora batterica in bilirubina, poi in urobilinogeno. L'urobilinogeno è infine convertito in urobilina, che va ai reni ed escreta con l'urina, o in stercobilina, che dà il colore alle feci.

Un funzionamento anormale del fegato o un blocco di secrezione della bile portano all'accumulo di bilirubina nel sangue; come risultato, la pelle e i bulbi oculari assumono un colorito giallastro, una condizione che viene chiamata itterizia.

### *Porfirie*

Le porfirie sono un gruppo di malattie genetiche causate da difetti della via di biosintesi che dalla glicina porta alle porfirine; specifici precursori della porfirina si accumulano negli eritrociti, nei liquidi corporei e nel fegato. La forma più comune è la porfiria acuta intermittente. I soggetti che ereditano questa condizione sono per la maggior parte eterozigoti e in genere sono asintomatici, perché una singola copia del gene normale fornisce un sufficiente livello di enzima funzionante. Però alcuni fattori nutrizionali e ambientali (ancora oggi non ben conosciuti) possono causare un aumento del 8-ammino-levulinato e del porfobilinogeno, che provoca forti dolori addominali e disfunzioni neurologiche. Re Giorgio III, il monarca inglese che regnò durante la Rivoluzione americana, soffriva di ricorrenti episodi di apparenti disturbi mentali, che hanno, per così dire, macchiato l'esistenza di un uomo per il resto assolutamente normale. La sua sintomatologia fa ritenere che egli soffrisse di porfiria acuta intermittente.

### *Plasmodium falciparum e cristalli di beta ematina*

Nella malaria il plasmodium si inserisce e riproduce nei globuli rossi dove svolge il suo ciclo, riproducendosi.

Durante lo stadio negli eritrociti, il parassita ottiene energia dalla proteolisi attraverso un processo di degradazione della cellula, che porta al rilascio dell'eme.

L'eme è tossico per il parassita, perché degrada le pareti cellulari e ne dà negli alcuni enzimi.

Poiché il plasmodium non riesce a degradare l'eme, lo sequestra nel vacuolo, dove forma dei cristalli di emozina: gruppi eme sono legati da atomi di ferro e catene di proprionato.

I farmaci antimalarici, come le cloroquine, sono efficaci nello stadio della malaria svolto negli eritrociti. Questo farmaco attraversa facilmente le membrane cellulari, si accumula nel vacuolo del parassita e in ambiente acido diventa carico: diventa acido e inibisce l'emepolimerasi (enzima che cristallizza eme nella forma dell'emozina).

Alcuni plasmodi però hanno sviluppato resistenza.

### **Ormoni e neurotrasmettitori derivati dagli amminoacidici**

Molti importanti neurotrasmettitori sono ammine primarie o secondarie, che si formano dagli amminoacidi attraverso semplici reazioni. La tirosina produce una famiglia di catecolammine, che comprende la dopamina, la noradrenalina e l'adrenalina. I livelli di catecolammine sono correlati, tra l'altro, con le variazioni della pressione sanguigna. La glutammato decarbossilasi produce il  $\gamma$ -amminobutirrato (GABA), un neurotrasmettitore inibitorio associato agli attacchi epilettici. Un altro importante neurotrasmettitore, la serotonina, deriva dal triptofano. L'istidina mediante decarbossilazione forma l'istamina, un potente vasodilatatore presente nei tessuti animali. L'istamina viene rilasciata in grandi quantità come parte della risposta allergica e stimola la secrezione acida nello stomaco.

La reazione di sintesi passa solitamente attraverso la formazione di una base di Schiff, che stabilizza il carboanione nella decarbossilazione (prima fase).

Il GABA e la serotonina sono prodotti con la sola decarbossilazione, mentre la serotonina è prodotta dalla idrossilazione del triptofano in due fasi, con la triptofano idrolasi.

Le catecolammine sono sintetizzate dalla tyr con le seguenti reazioni:

1. Idrossilazione della tyr a L-dopa
2. Decarbossilazione della L-dopa a dopamina
3. Idrossilazione a norepinefrina
4. Metilazione del gruppo amminico della norepinefrina da parte della S-adenosil-metionina, per produrre epinefrina.

Anche altri ormoni derivano dalla tyr.

Le poliammine come la spermina e la spermidina, coinvolte nel processo di impacchettamento del DNA, derivano dalla metionina e dall'ornitina. Il loro metabolismo è importante per la regolazione epigenetica, perché si riflette nella produzione di proteine metilate e acetilate, e nella metilazione stessa del DNA.

### **Amminoacidici precursori della creatina e del glutatione**

Il glutatione è un tripeptide che contiene un gamma-ammide. Partecipa a diversi processi metabolici di trasporto e detox. Ad esempio è substrato di reazioni di perossidazione, che aiutano a distruggere i perossidi formati nelle ossidazioni. È anche coinvolto nella produzione di NADPH, e nella biosintesi dei leucotrieni (coinvolti in reazioni allergiche e infiammatorie).

Nella sua forma ossidata due molecole di glutatione sono unite da un ponte di solfuro, tramite la cisteina: questo aiuta a mantenere i gruppi solforici delle proteine nel corretto stato di oss.

Il ciclo del glutammide è un veicolo di trasporto di AA nella cellula, attraverso la sintesi e rottura della molecola di glutatione.

In queste reazioni di sintesi del glutatione l'atp fornisce l'energia per ogni reazione, mediante l'attivazione del gruppo carbossilico con formazione di un acilfosfato intermedio, per generare il legame peptidico.

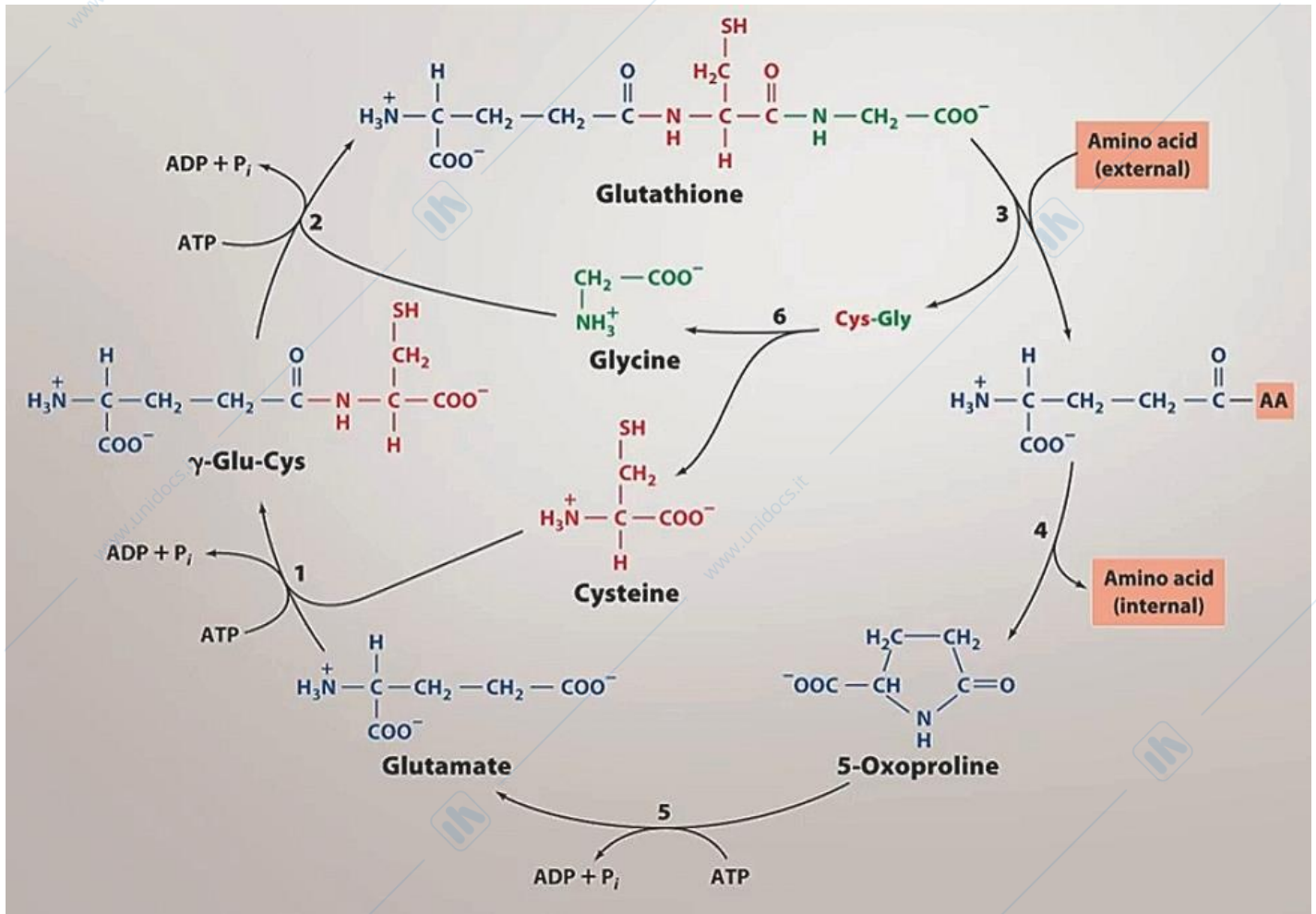
La sintesi della gamma-glutamilmcisteinilglicina (glutatione) avviene tramite l'aggiunta degli amminoacidi, usando atp (come appena visto).

La rottura della molecola avviene invece attraverso diversi enzimi, come la gamma-glutamilmtraspeptidasi (rimozione del dimero cys-gly).

L'intermedio viene poi ciclizzato a ossoprolina e viene trasformato poi in glutammato. Una proteasi cellulare scinde invece il dimero cys-gly, formatosi prima.

La creatina è sintetizzata partendo da glicina e arginina, coinvolgendo anche la metionina come S-adenosil-metionina (trasportatore di gruppi metilici).

Dalla creatina si origina la fosfocreatina, molecola ad alta energia usata nel muscolo scheletrico

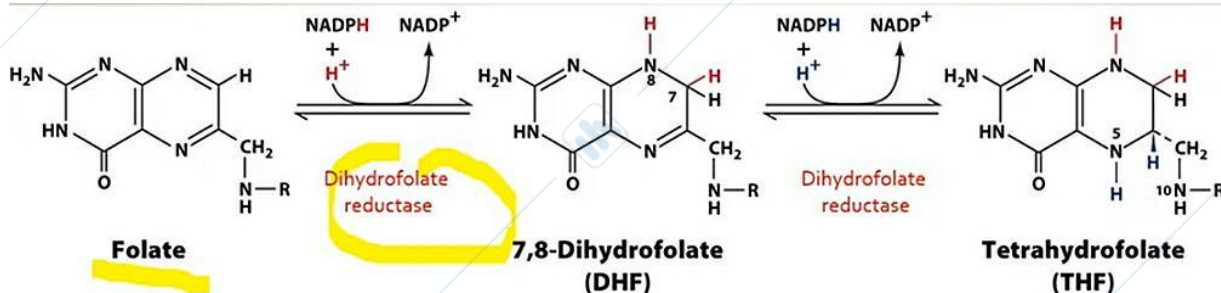


### Coenzimi

#### THF (tetraidrofolato)

È un coenzima molto versatile usato per trasportare unità monocaboniose a diversi grado di ossidazione dell'atomo di carbonio.

È formato da un acido pterico (2-ammino-4-ossopterina e acido p-amminobenzoico) e glutammato. Il THF deriva dall'acido folico, che può essere doppiamente ridotto per formare il coenzima attivo, grazie alla diidrofollato reductasi. I mammiferi non sintetizzano acido folico, e deve essere quindi assunto con la dieta o fornito dai m.o. intestinali.



Le unità carboniose sono attaccate alle posizioni N-5, N-10 o ad entrambe, formando dei derivati del THF.

Le unità monocaboniose trasportate dal THF sono tutte interconvertibili attraverso REDOX.

Le unità monocaboniose introdotte dal THF possono avere diversi destini:

- Essere usate direttamente come N<sup>5</sup>-N<sup>10</sup>metilene-THF nella conversione di deossiribonucleotidi dUMP a TMP dalla timidilato sintasi



- Inducibile
- Endoteliale
- Neuronale

Sono tutte simili e fatte da 2 subunità, fatte da domini funzionali. Ogni monomero subisce diversi cambiamenti conformazionali, durante il trasferimento degli elettroni tra le diverse subunità.

